

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **05005741 A**

(43) Date of publication of application: **14.01.93**

(51) Int. Cl.

G01N 33/543

(21) Application number: **03198784**

(22) Date of filing: **12.07.91**

(30) Priority: **09.10.90 JP 02270900**

(71) Applicant: **IDEMITSU PETROCHEM CO LTD**

(72) Inventor:
**OSAWA SUSUMU
SHIBATA KAZUNORI
TAKASE MINORU
KONO TAKAYUKI**

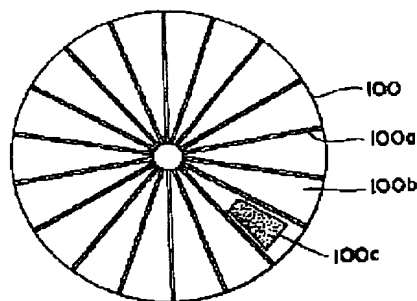
(54) **METHOD FOR IMMUNOLOGICAL
QUANTITATIVE ANALYSIS**

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio

(57) Abstract:

PURPOSE: To expand a sphere of concentration to be measured, to make sensitivity and speed high and to attain full automation.

CONSTITUTION: An antibody 100c is fixed in a part of at least one of a plurality of flow passages formed along the radial direction on a rotatable disk 100. After humor is introduced into the inner peripheral parts of the flow passages 100b, the disk is rotated to develop the humor on the disk, and thereby an antigen being an object of analysis in the humor is made to be supplemented by the antibody 100c fixed on the disk, through an antigen-antibody reaction. Moreover, an insoluble carrier particle prepared by fixing an antibody reacting specifically with the antigen is made to act on the antigen and the number of the insoluble carrier particles caught by the antigen is counted, with the disk rotated, by using an optical reading device being movable freely in the radial direction of the disk, whereby the analysis is executed.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-5741

(43) 公開日 平成5年(1993)1月14日

(51) Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 33/543

E 7906-2 J

R 7906-2 J

L 7906-2 J

審査請求 未請求 請求項の数5 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平3-198784

(22) 出願日 平成3年(1991)7月12日

(31) 優先権主張番号 特願平2-270900

(32) 優先日 平2(1990)10月9日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000183657

出光石油化学株式会社

東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

(72) 発明者 大澤 進

千葉県四街道市みそら4-17-9

(72) 発明者 柴田 和典

千葉県袖ヶ浦市上泉1660番地 出光石油化学株式会社内

(72) 発明者 高瀬 實

千葉県袖ヶ浦市上泉1660番地 出光石油化学株式会社内

(74) 代理人 弁理士 渡辺 喜平 (外1名)

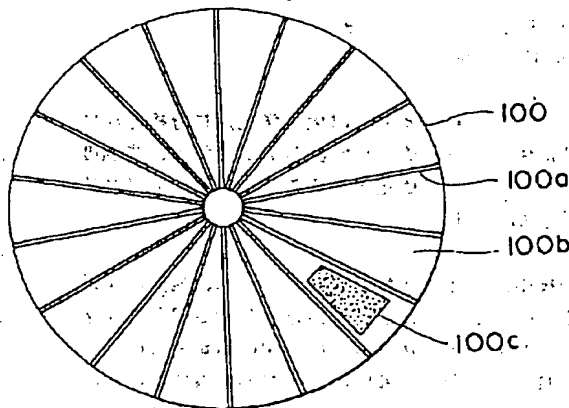
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫学的定量分析方法

(57) 【要約】

【目的】 免疫学的定量分析方法において、測定濃度領域の拡大、高感度化、高速度化および全自動化を図る。

【構成】 回転可能なディスク100上の半径方向に沿って形成した複数の流路100bの少なくとも1つの流路の一部に抗体を固定しておき(100c)、前記流路100bの内周部に体液を導入した後、ディスクを回転して体液をディスク上に展開して、体液中の分析対象物である抗原を、ディスク上に固定された抗体に、抗原-抗体反応により補足せしめた後、さらに該抗原に、その抗原と特異的に反応する抗体を固定してなる不溶性担体粒子を作用させ、前記抗原により捕捉された不溶性担体粒子の数をディスクの半径方向に自在に移動可能な光学読み取り装置を用いて、ディスクを回転させながら計数することによって分析を行なう。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 回転可能なディスク上の半径方向に形成した複数の流路の少なくとも1つの流路の一部に抗体を固定し、前記流路の内周部に体液を導入した後、ディスクを回転して体液をディスク上に展開し、体液中の分析対象物である抗原を、ディスク上に固定された抗体に抗原-抗体反応により捕捉せしめた後、さらに該抗原に、その抗原と特異的に反応する抗体を固定してなる不溶性担体粒子を作用させ、前記抗原により捕捉された不溶性担体粒子の数を、ディスクの半径方向に移動可能な光学読み取り装置を用いて、ディスクを回転させながら計数することを特徴とした免疫学的定量分析方法。

【請求項2】 回転可能なディスク上の半径方向に形成した複数の流路の少なくとも1つの流路の一部に抗原を固定し、前記流路の内周部に体液を導入し、体液中の分析対象物である抗体を、固定された抗原との抗原-抗体反応により捕捉せしめた後、さらに該抗体に、その抗体と特異的に反応する抗原を固定してなる不溶性担体粒子を作用させ、前記抗体により捕捉された不溶性担体粒子の数を、ディスクの半径方向に移動可能な光学読み取り装置を用いて、ディスクを回転させながら計数することを特徴とした免疫学的定量分析方法。

【請求項3】 光学読み取り装置の光源が収束レーザー光源であることを特徴とする請求項1または2記載の免疫学的定量分析方法。

【請求項4】 不溶性担体粒子の粒子径を、使用光源波長の1/5～1倍の大きさとしたことを特徴とする請求項1、2または3記載の免疫学的定量分析方法。

【請求項5】 不溶性担体粒子の粒子径を、0.1～5 μ mの大きさとしたことを特徴とする請求項1、2または3記載の免疫学的定量分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は免疫学的定量分析方法に関し、特に免疫学的検査の測定濃度領域の拡大、高感度化、高速化及び全自動化を図ることのできる免疫学的定量分析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、医療分野においては、病気の早期発見等を目的として、体液中の微量成分の定量分析が頻繁に行なわれている。例えば、血液中の微量成分の定量が行なわれているが、血液に含まれる体液成分はその濃度がng(ナノグラム)/mlオーダーと極めて微量なものが多く、これらの微量成分を定量的に分析することは医療分野における重要な課題となっている。

【0003】 従来、血液微量成分の測定には、ラジオ免疫検査法(RIA法)、酵素免疫検査法(EIA法)あるいはラテックス凝集反応法(LIA法)などの免疫学的手法が用いられてきた。ここで、ラジオ免疫検査法(RIA法)は、放射性同位元素でラベルした抗体を用

いて抗原-抗体反応を行なわせ、放射線量より抗原の濃度を求める方法である。

【0004】 また、酵素免疫検査法(EIA法)は、酵素でラベルした抗体を用いて抗原-抗体反応を行なわせ、酵素反応による発色の程度により抗原の濃度を求める方法である。さらに、ラテックス凝集反応(LIA法)は、1965年にSingerとPlotzらによって開発された方法であり、抗体を固定してなる不溶性担体粒子(ラテックス)を用いて抗原-抗体反応を行なわせ、ラテックス粒子の凝集を生じさせて、濁度から抗原の濃度を求める方法である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、上述した従来の血液微量成分の免疫学的定量分析法には、以下に示す問題がある。すなわち、ラジオ免疫検査法(RIA法)は、感度がよく精度が高いものの、放射線を使用するため安全性の面で問題があり、また保守、管理上細心の注意を払う必要があり、取扱いが非常に面倒であった。

【0006】 また、酵素免疫法(EIA法)は、RIA法と同様に、感度がよく精度が高いものの、酵素を用いているため試薬の調製に時間と労力を要し、酵素の保管、保存の面でも細かい配慮を必要とし、測定時間も45分～数時間と長時間を要するという問題がある。さらに、ラテックス凝集法(LIA法)は、濁度を目視法によって判断するものであるため、半定量的であり、感度及び精度が不十分であるという問題がある。

【0007】 なお、LIA法において、濁度を光学的に測定する方法が提案されている(1)Croatica Chemica Acta 42(1970) P457-466-, 2) European Journal of Biochemistry Vol.20 No.4 (1971) P553-560, 3) Immunochimistry Vol.12 P349-851(1975) 参照)。しかし、この方法は、実験によると精度が悪く、また感度の面でもEIA法やRIA法に劣るという問題がある。また、LIA法において、ラテックスの径を種々変えて測定する方法(特開昭63-65369号)や、あるいは凝集したラテックスを順々に管内に流し光学的に測定する方法(特開昭60-111963号)が提案されているが、この方法は、感度の向上を図ろうとすると、それに伴って全体の作業が煩雑化し、高速化が図れないという問題がある。

【0008】 一方、特開昭56-151357号には、抗体を固定化したディスクに被検液を接触させ、次いで抗体を固定した微粒子を反応させた後、ディスク上に捕捉された微粒子の数を計数することを特徴とする方法が開示されている。そして、ディスク上の異なる領域のそれぞれに異なる種類の抗体を固定することによって、同時多項目分析が可能である旨が記載されている。しかしながら、特開昭56-151357号には、抗体固定化ディスクとしてスライドガラスを用いた例が示されているにすぎず、ディスクを用いる技術に関しては何ら開示されていない。ス

3

ライドガラスを用いた場合には、スライドガラス上への被検液の滴下、洗浄及び計測を自動的かつ迅速に行なうことが困難である。また、被検液はスライドガラス上に滴下されるだけで薄膜状に展開されないで、反応効率を高めることが困難である。さらに、抗体固定微粒子の計測手段として顕微鏡等を用いているため、計測の自動化及び高速化が著しく困難であるという問題がある。

【0009】また、特開昭64-35373号には、上記特開昭56-151357号に記載の方法において微粒子として蛍光ラベックスを使用し、さらに計数手段として蛍光顕微鏡、TVカメラ、画像処理装置を用いることにより、計数の高感度化を図った技術が開示されている。しかし、これらの計数手段は、光ディスク技術を利用した計数手段に比べ、計数の自動化、高速度化及び高感度化が困難であるという問題がある。

【0010】本発明は上述した問題点にかんがみてなされたもので、免疫学的検査の高感度化及び全自動化、高速度化を図ることのできる免疫学的定量分析方法の提供を目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、抗体固定ディスクとして回転可能なディスクを使用するとともに、抗体固定微粒子の計数を光ディスク技術を利用して、ディスクを回転させながら光ヘッドで走査して行なうことにより、計数の自動化、高速化及び高感度化を図れることを見出した。そして、ディスクへの被検液の滴下（分注）、被検液の展開及び洗浄等の分析に必要な一連の走査をディスク上で全て行なわせると、分析の完全自動化及び迅速化が達成できることを見出し本発明を完成させるに至った。

【0012】すなわち本発明の免疫学的定量分析方法は、回転可能なディスク上の半径方向に形成した複数の流路の少なくとも1つの流路の一部に抗体もしくは抗原を固定し、前記流路の内周部に体液を導入した後、ディスクを回転して体液をディスク上に展開し、体液中の分析対象物である抗原もしくは抗体を、ディスク上に固定された抗体もしくは抗原に抗原-抗体反応により捕捉せしめた後、さらに該抗原もしくは抗体に、その抗原もしくは抗体と特異的に反応する抗体もしくは抗原を固定してなる不溶性担体粒子を作用させ、前記抗原もしくは抗体により捕捉された不溶性担体粒子の数を、ディスクの半径方向に移動可能な光学読み取り装置を用いて、ディスクを回転させながら計数するようにしてあり、好ましくは、光学読み取り装置の光源を収束レーザー光源とし、さらに好ましくは、不溶性担体粒子の粒子径を使用光源波長の1/5～1倍の大きさ、具体的には不溶性担体粒子の粒子径を0.1～5 μm の大きさとしてある。

【0013】

【実施例】以下、本発明を図面を参照しつつ詳細に説明

4

する。図1は本発明の免疫学的定量分析方法の手順を示す説明図である。本発明の免疫学的定量分析方法においては、抗体200を固定したディスク100（以下、抗体固定ディスクという）を使用する（図1(I)）。

【0014】ここで、ディスク100の大きさ、厚さ、形状等は適宜選択され特に制限されないが、試料の展開及びレーザー光等による分析に適するように、回転可能なものであることが必要であり、このような観点からすると円板状（ディスク状）であることが好ましい。また、図2に示すように、ディスク100に多数の突条100aを放射状に形成して多数の試料展開面100b及び抗体200を固定した反応部100cを設けると、多数の試料の分析を同時に行なえる。

【0015】ディスク100の形成材料としては、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリウレタン、エポキシ樹脂等のプラスチック材料やガラス等の透明材料が挙げられるが、好ましくは、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート等のプラスチックディスクである。このようにディスクを透明材料で形成するのは、レーザー等による光学的分析を可能とするためである。

【0016】ディスク100に固定される抗体200は、測定しようとする抗原によって異なるが、例えば、測定しようとする抗原をある免疫動物（例えば、兎、山羊、羊など）に投与して産生させたポリクローナル抗体やモノクローナル抗体等が挙げられる。

【0017】抗体200をディスク100に固定するには、例えば、抗体の0.05M トリス緩衝食塩水（TBS）溶液（pH8.2、濃度0.5～10 $\mu\text{g/ml}$ ）あるいは0.05M 炭酸-重炭酸緩衝溶液（pH9.6、濃度0.5～10 $\mu\text{g/ml}$ ）をディスク上に滴下し、4 $^{\circ}\text{C}$ の温度下で一昼夜（あるいは20～30 $^{\circ}\text{C}$ で2時間）放置して、抗体200をディスク100上に物理的に吸着させればよい。この場合、ディスク表面にスルホン基、アミノ基、カルボキシル基またはその誘導体等の官能基を有するディスクを用いることにより、抗体をディスク上に化学結合させることもできる（P.Tijssen著、石川栄治監訳“生化学実験法11 エンザイムノアッセイ”、東京化学同人刊、岩崎辰夫、安東民衛著“単クローン抗体ハイブリドーマとELISA”講談社刊参照）。

【0018】本発明方法においては、まず、上記抗体固定ディスク100上で、試料中の抗原300を抗原-抗体反応により捕捉せしめる（図1(II)）。ここで、分析対象とされる試料としては、抗原を含む液体であれば特に制限されない。例えば、血液、尿等の体液を挙げることができる。分析対象物である抗原は特に制限されないが、例えば、C-反応性蛋白質（CRP）、 α -フェトプロテイン（AFP）、癌胎児性抗原（CEA）等が挙げられる。

【0019】ディスク100上で抗原-抗体反応を行な

わせるには、例えば、抗体固定ディスク上に分析対象物である抗原300を含んだ検体試料を適量（例えば50 μ l程度）滴下し、ディスク100を回転して、遠心力によって検体試料をディスク100上に薄膜状に展開することによって、ディスク100上に固定された抗体200と検体試料中の抗原300との間に効率よく抗原-抗体反応を行なわせることができる。この場合、抗原-抗体反応に要する時間は1～5分程度の短い時間で済む。抗原-抗体反応後、捕捉された抗原300以外の残余の検体試料は、リン酸緩衝食塩水（PBS）（pH7.4）、あるいはトリス緩衝食塩水（TBS）（0.05M, pH8.2）等を適量（例えば、1ml程度）滴下した後、ディスク100を回転して洗い流す。次いで、上記抗原-抗体反応後のディスク100に、抗原300と特異的に反応する抗体400を固定してなる不溶性担体粒子500を作用させる（図1(III)）。

【0020】ここで、抗体400を固定してなる不溶性担体粒子500とは、不溶性担体粒子（ラテックス）（例えば、プラスチック粒子、コロイド粒子等）に、分析対象物である抗原300に対する抗体400を、物理的あるいは化学的に吸着または結合させて固定したものをいう。具体的には、例えば、1.0%ラテックス水溶液に抗体を入れ、温室で2時間放置して、ラテックスに抗体を物理吸着させる。その後、遠心分離にかけて上清を捨て、吸着されなかった抗体を除去し、沈殿部にリン酸緩衝食塩水（PBS）（pH7.4）を注ぎ、再分散させて作成される（特開昭62-267298号、Applied and Environmental Microbiology, Oct. 1988, P2345-2348参照）。

【0021】不溶性担体粒子は、蛍光性を有するもの、あるいは着色されたものであってもよい。この場合、蛍光性あるいは着色性を利用した分析が可能となる。なお、不溶性担体粒子自体が蛍光物質で形成されている場合の他、蛍光材料でコーティングされている場合や蛍光物質が不溶性担体粒子に付着している場合も含まれる。なお、不溶性担体粒子の粒径については後述する。

【0022】上記のように調製された抗体を固定してなる不溶性担体粒子を含んだ水溶液は、上述した抗原-抗体反応後のディスク100に適量（例えば、50 μ l）滴下され、ディスク100の回転によって展開されて、ディスク100上に固定された抗体200に捕捉された抗原300と、再度抗原-抗体反応を起こし、不溶性担体粒子500に固定された抗体400を介して、不溶性担体粒子が捕捉される（図1(III)）。ディスク上に捕捉されなかった不溶性担体粒子は、上述した検体試料と同様の方法で洗い流される。このようにして、サンプルディスクが作製される。

【0023】次に、上記サンプルディスク上の抗原によって捕捉された不溶性粒子の数または粒子数に相当する物理量を測定手段600で測定して、抗原300の数

（抗原の濃度）を求める（図1(IV)）。ここで、粒子数等の測定手段600としては、光学的測定手段が好ましい。光学的測定手段としては、反射率の変化、特定波長の光に対する吸収、蛍光強度あるいは偏光した光の変光面の回転等の測定手段が例示される。

【0024】不溶性担体粒子の数を直接測定する場合には、光学的測定手段としてレーザーを用いる。使用されるレーザー源としては、一般に使用されている半導体レーザー等をそのまま利用でき、不溶性担体粒子の大きさに応じて適当なレーザー源が選択される。光学的測定手段を具備した分析装置としては、例えば、図3に示すような装置が使用される（特願平1-092367号参照）。

【0025】同図において、100はディスクであり、回転テーブル2上に装着されている。ディスク100の下部外周には、ディスク100から落ちる試料を受けるための受け皿6が配置され、回収タンク7に回収されるようになっている。モータ8はディスク100を回転させるためのものであり、駆動制御回路9はモータ8の駆動を制御するものである。ノズル11は、試料送り装置12から送られる試料をディスク100上に滴下する。光学式測定ヘッド14は、ディスク半径方向に延びる送りねじ軸15に沿って往復移動する。モータ16はヘッド14を駆動するためのものであり、駆動制御回路17はモータ16の駆動を制御する。光学式測定ヘッド14はレーザー光の投光部と受光部を有し、図4(a)に示すように、投光部からの照射光19はハーフミラー20、レンズ21を経て投束光として試料展開面5上の試料に照射され、試料から反射された反射光22は受光部で受けられるようになっている。なお、図4(b)に示すように、ディスクの裏面側から照射光19を照射するようにしてもよく、また、反射光でなく、透過光によって分析を行なうようにしてもよい。これらの場合には回転テーブル2を透明材料で形成するか、あるいは回転テーブル2を取り払う。

【0026】信号処理装置23は、ヘッド14に信号を送り光源を点灯させる機能と、ヘッド14で受光された光信号を処理し、分析する機能を有する。ディスプレイ装置24は分析結果を画面表示し、記録装置25は分析結果をプリントアウトして出力する。CPU（中央処理装置）23は、試料送り装置12、駆動制御回路9及び17、信号処理装置23等の制御を行ない、これをプログラム通り作動させる。CPU27は、プログラムの操作装置28と、プログラムの記憶装置29を有している。

【0027】上記構成からなる分析装置によれば、免疫学的定量分析の全ての工程をディスク上で行なうことができ、また、分析の全自動化を図ることができる。不溶性担体粒子が蛍光を発するものである場合には、光学的測定手段としてフォトディテクターを用いる。この場合、フィルターを介在させることによって、特定波長（例えば、397nm, 472nm, 577nm など）の蛍光強度を

検出し(図5(a))、その蛍光強度を粒子数に換算する(図5(b))。

【0028】なお、光学的測定手段と不溶性担体粒子の粒径との関係については次のことがいえる。光学的測定手段としてレーザーを用いる場合には、不溶性担体粒子の粒径が小さくなるとレーザー光に対する信号が弱くなりS/N比が悪くなるので好ましくない。一方、蛍光を発する不溶性担体粒子を用いる場合には、蛍光強度を粒子数に換算して、抗原濃度を測定しているため、粒径が小さくてもよい。上記の観点及び抗原-抗体の反応性からすると、不溶性担体粒子の粒径は0.1~5 μ mの範囲内であることが好ましい。

【0029】計測した不溶性担体粒子の個数から抗原の濃度を求めるには、抗原濃度既知の試料を用いること以外は上述の場合と同様にし、抗原濃度と不溶性担体粒子の数との関係を求めてあらかじめ検量線を作成しておく、この検量線から抗原濃度を求めればよい。なお、上述した本発明の免疫学的定量分析方法においては、説明の都合上、ディスク/抗体/抗原/抗体/不溶性担体粒子の構成となる場合を示したが、かわりに、ディスク/抗原/抗体/抗原/不溶性担体粒子の構成とし、抗体濃度の定量を行なうものとしてもよい。

【0030】

【実施例】以下、実施例にもとづき本発明をさらに詳細に説明する。

実施例1

C-反応性蛋白質(CRP)抗体のトリス緩衝食塩水(TBS)溶液(濃度5.06 $\times 10^{-6}$ g/ml)5 μ lを、半径6.5cmの回転可能なポリカーボネートディスクの半径4cmの地点に滴下し、ディスクを回転させて30.0mm²の薄膜状に均一に展開した。温室で2時間放置した後、TBS溶液(0.05M, pH8.2)200 μ lで3回洗浄して抗体固定ディスクを作成した。

【0031】また、粒径0.2 μ mの不溶性担体粒子(ポリスチレンラテックス)を1wt%含むリン酸緩衝食塩水(PBS)(pH7.4)中に、ヒトCRPを兎に投与して得られた抗CRP抗体を入れ、十分攪拌してポリスチレンラテックスにCRP抗体を固定(感作)させた。これを遠心分離にかけた後、上清を除き、沈殿したラテックスをPBSに再分散させ、抗体固定不溶性担体粒子(抗CRPラテックス)を作製した。

【0032】次いで、検量線作成のため、上記抗体固定ディスクを図3に示す分析装置の回転テーブル上にセットしTBSで調製したCRP濃度既知の標準試料(1.0 $\times 10^{-12}$ g/ml, 1.0 $\times 10^{-11}$ g/ml, 1.0 $\times 10^{-9}$ g/ml, 1.0 $\times 10^{-7}$ g/ml, 1.0 $\times 10^{-6}$ g/ml, 1.0 $\times 10^{-5}$ g/ml)を上記で作成した抗体固定ディスク上の抗体固定部に10 μ l滴下し、30℃で5分間反応させ、抗体固定ディスク上に固定された抗体に抗原を捕捉させた。その後、TBS

(0.05M, pH8.2)200 μ lで3回洗浄して残ってい

る試料を除去した。さらに、このディスク上に上記で作成した抗CRPラテックスのPBS溶液(ラテックス粒子径0.2 μ m, 1wt%)50 μ lを、ディスク半径4cmの地点に滴下し、回転により展開して、30℃で5分間、インキュベーションし、その後TBS(0.05M, pH8.2)200 μ lで3回洗浄して検量線作成のためのサンプルディスクを作成した。

【0033】その後、1800rpmで回転させながら、ディスク上に捕捉されたラテックス粒子の個数を光学ヘッド14(830nmの波長の半導体レーザーを光源とする)で走査しながら計測した。この結果を表1に示す。また、この結果をもとに抗原濃度とラテックス粒子の個数の関係をグラフ化し、図6に示すような検量線を得た。

【0034】次に、被検者から採血した血液を常法(遠心分離)によって血清分離し、CRP濃度未知の試料を3種類用意し、各試料を本発明方法及び従来法(LIA法、三菱化成社製免疫学的抗原測定装置LPIA100M使用)の両方法でCRP濃度の定量を行なった。

【0035】なお、本発明方法の手順は上述した検量線の作成の場合と同様であり、分析装置に装着した抗体固定ディスク上に被検試料を滴下し反応させ、さらにその上に抗CRPラテックスを50 μ l滴下し反応させ、ディスク上にラテックスを捕捉させたラテックス粒子の個数を計測し、この計測されたラテックスの個数から、図6に示す検量線にもとづきCRP濃度を求めた。反応時間は10分、ラテックス計測時間5分、合計15分間であった。上記両方法によるCRP濃度の定量結果を表2に示す。

【0036】実施例2

不溶性担体粒子として、励起波長560nm、蛍光波長577nmを有する赤色蛍光物質を含有した粒径0.5 μ mのポリスチレンラテックスを用いたこと、TBSで調製したCRP濃度既知の標準試料の濃度を、1.0 $\times 10^{-13}$ g/ml, 1.0 $\times 10^{-12}$ g/ml, 1.0 $\times 10^{-9}$ g/ml, 1.0 $\times 10^{-7}$ g/ml, 1.0 $\times 10^{-5}$ g/ml, 1.0 $\times 10^{-3}$ g/mlとしたこと、及び図3に示す分析装置における光学的測定ヘッドを560nm付近の単色光源及びフォトディテクターとし、図5に示したようにして蛍光強度からラテックスの個数を換算して検量線を作成したこと以外は実施例1と同様にして、上記CRP濃度未知の検体100倍希釈(TBSに希釈)試料についてCRP濃度の定量を行なった。反応時間は10分、ラテックス計測時間は3分、合計13分間であった。CRP濃度の比較結果を表3に示す。また、得られた検量線を図7に示す。

【0037】

【表1】

抗原濃度(g/ml) ラテックス数(個/360 μ m²)

1 $\times 10^{-12}$ 1200

	9		10
1×10^{-11}	1460	$* 1 \times 10^{-5}$	3360
1×10^{-9}	2200		
1×10^{-7}	2890	[0038]	
1×10^{-6}	3150	* [表2]	

検体番号	CRP濃度 (ng/ml)	
	本発明法	L I A法
1	319	320
2	541	540
3	210	210

【0039】

【表3】

検体番号	CRP濃度 (ng/ml)	
	本発明法	L I A法
4	3.3	測定不能
5	5.4	6
6	2.0	測定不能

【0040】

【表4】

抗原 (AFP) 濃度 (g/ml)	ラテックス 数 (個/1000 μm^2)
1.0×10^{-12}	270
1.0×10^{-10}	395
1.0×10^{-8}	630
1.0×10^{-6}	1410

【0041】表2及び表3から明らかなように、本発明方法は従来法 (L I A法) に比べ、0.01~ 0.1 (ng/ml) のオーダーまで測定でき、感度が高く、したがって1 ng/ml以下の極微量成分の定量が可能となる。また、検査にかかる所要時間は、従来法 (L I A法) が1~2時間なのに対し、本発明方法は10分~30分であり、検査の高速化を実現しうる。さらに、従来法 (L I A法、E I A法) は出力信号がアナログなのに対し、本発明方法においては出力信号をデジタル化できるため S/N比の向上、回路の簡便さという利点を有する。

【0042】実施例3 α -フェトプロテイン (AFP) の定量

(1) ヒトAFPを予め兔に投与して得られたAFP抗体 (IgG) を従来法 (石川栄治: 酵素免疫測定法 第3版 医学書院、小山次郎、大沢利昭著: 免疫学の基礎 東京化学同人刊 P30~P34 参照) によりペプシンで消化し、IgGの不変領域Fc部を除去し抗原抗体反応形成

部位である (Fab')₂ を得た。(図8参照)。

【0043】(2) 上記実施例と同様にチャンネルを設けた回転可能なポリカーボネートディスク上のチャンネル内の半径3.5cmの部位に地点に (Fab')₂ のTBS溶液 (濃度 2.3×10^{-4} g/ml) 20 μ l を滴下し、30℃の状態では2時間静置しディスク上に抗体感作 (物理吸着) させた。その後吸着されなかった抗体をTBS 200 μ l で3回洗浄し除去した。

【0044】(3) BSA (牛血清アルブミン) 0.5% 含有TBS溶液10 μ l を該抗体固定位置に滴下し、4℃の状態では24時間静置し、その後、界面活性剤であるTween-20を0.1%含有したTBS溶液 (pH 8.2) 200 μ l で3回洗浄した。

【0045】(4) 一方、読み取り使用光源である半導体レーザー (波長780nm) の1/2.6倍波長の大きさである $\Phi 300\text{nm}$ (0.3 μm) のポリスチレンラテックスに上記 (1) で得た抗体を実施例1の如く抗体感作し、感作ラテ

11

ックスを作製した(ラテックス濃度: 0.25wt% TBS溶液)。

【0046】(5) 検量線作成のため濃度既知のAFP抗原標準溶液(1.0×10⁻¹²g/ml, 1.0×10⁻¹⁰g/ml, 1.0×10⁻⁸g/ml, 1.0×10⁻⁶g/ml TBSにより稀釈)を20μlディスク抗体固定部位に滴下し、30℃の状態で5分間静置し抗原抗体反応させ、ディスク固定抗体によりAFP抗原を捕捉させた。その後、未反応の試料は実施例1と同様にTween-20含有TBS溶液(Tween-20濃度 0.1%) 200μlで3回洗浄した。

【0047】(6) 上記(3)で調整したAFP抗体感作ラテックス20μlを該抗原捕捉部位に滴下し、30℃の状態で5分間静置し抗原抗体反応させ、該抗原にラテックスを捕捉させた。捕捉されずに残ったラテックスは、Tween-20含有TBS溶液200μlで3回、さらに蒸留水500μlで洗浄し塩とともに除去し、サンプルディスクを作製した。

【0048】(7) その後、サンプルディスクを1800rpmで回転させ波長780nmの半導体レーザーを光源とした図3に示した光学ヘッド14を走査させながらディスク上に捕捉されたラテックスの個数を計測した。計測結果を表4に示し、これらの個数をAFP抗原と関係をグラフ化した検量線を図9に示す。

【0049】(8) 被検者から採血した血液を実施例1同様、従来法で遠心分離し血清を得た。この血清20μlを上記(4)と同様に本発明法により反応させ、ラテックス数を計数し検量線から濃度を検出したところ、0.1ng/ml(1×10⁻¹⁰g/ml)の結果を得た。従来のRIAにより測定したところほぼ同じ結果が得られた。また、従来のLIA法の三菱化成LP1A100Mでは上記の被検試料は測定

12

出来なかった。被検試料滴下からラテックス個数計測までに要した時間は15分であった。

【0050】

【発明の効果】以上説明したように本発明の免疫学的定量分析方法によれば、免疫学的検査の測定濃度領域の拡大、高感度化及び高速度化を図ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の免疫学的定量分析方法の手順を示す説明図である。

10 【図2】複数試料の同時分析を行なうための複数に区画されたディスクを示す平面図である。

【図3】分析装置の一例を示す構成図である。

【図4】光学的分析手段による測定の様態を示す図である。

【図5】蛍光強度を粒子数に換算する方法を示すグラフである。

【図6】実施例1及び2における検量線を表わすグラフである。

20 【図7】実施例1及び2における検量線を表わすグラフである。

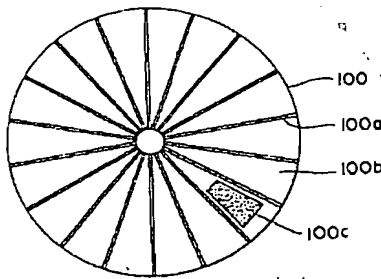
【図8】実施例3で用いた抗原抗体反応形成部位(Fab')₂を示す図である。

【図9】実施例3における検量線を表わすグラフである。

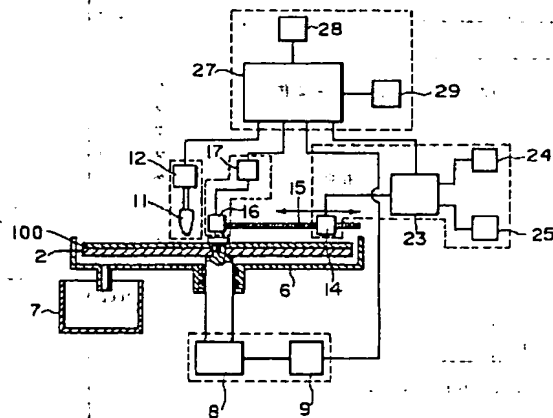
【符号の説明】

- 100 : ディスク
- 200 : 抗体
- 300 : 抗原
- 400 : 抗体
- 30 500 : 不溶性担体粒子

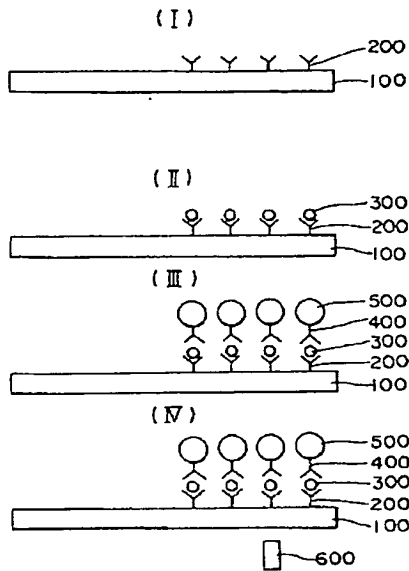
【図2】



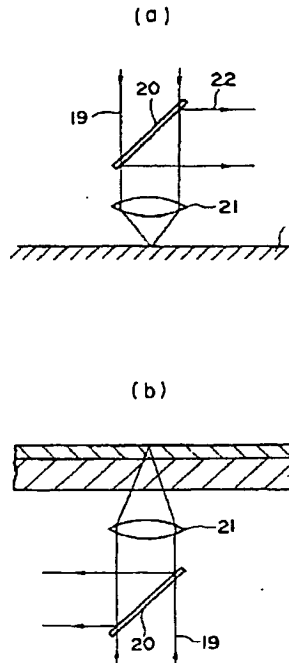
【図3】



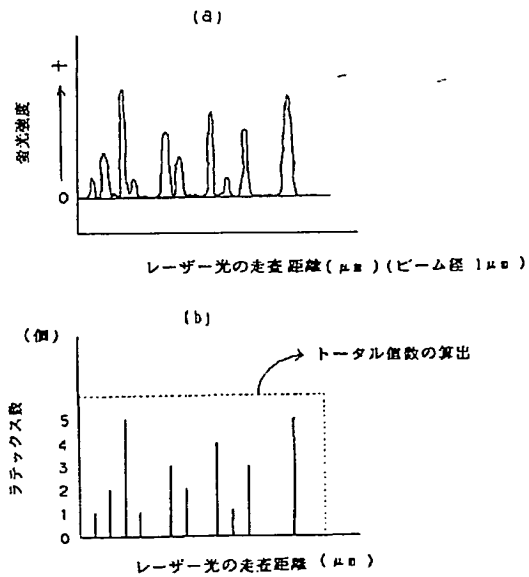
【図1】



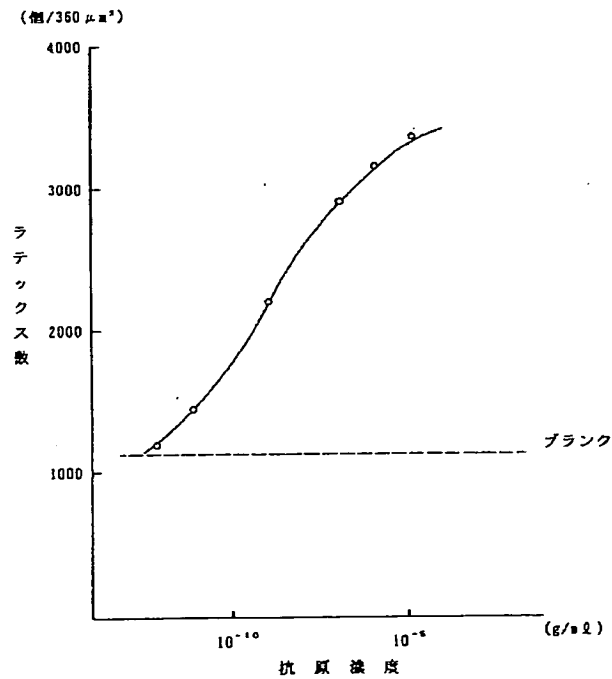
【図4】



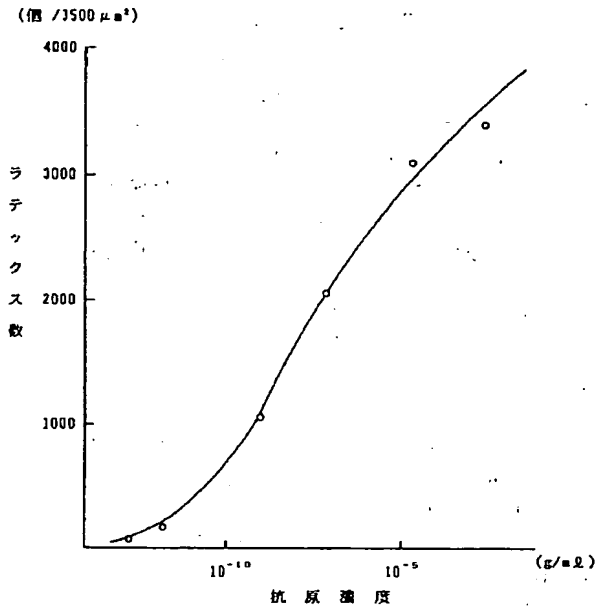
【図5】



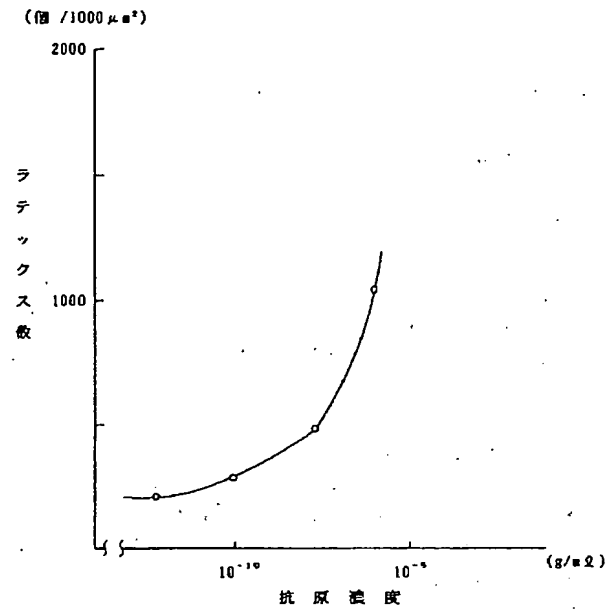
【図6】



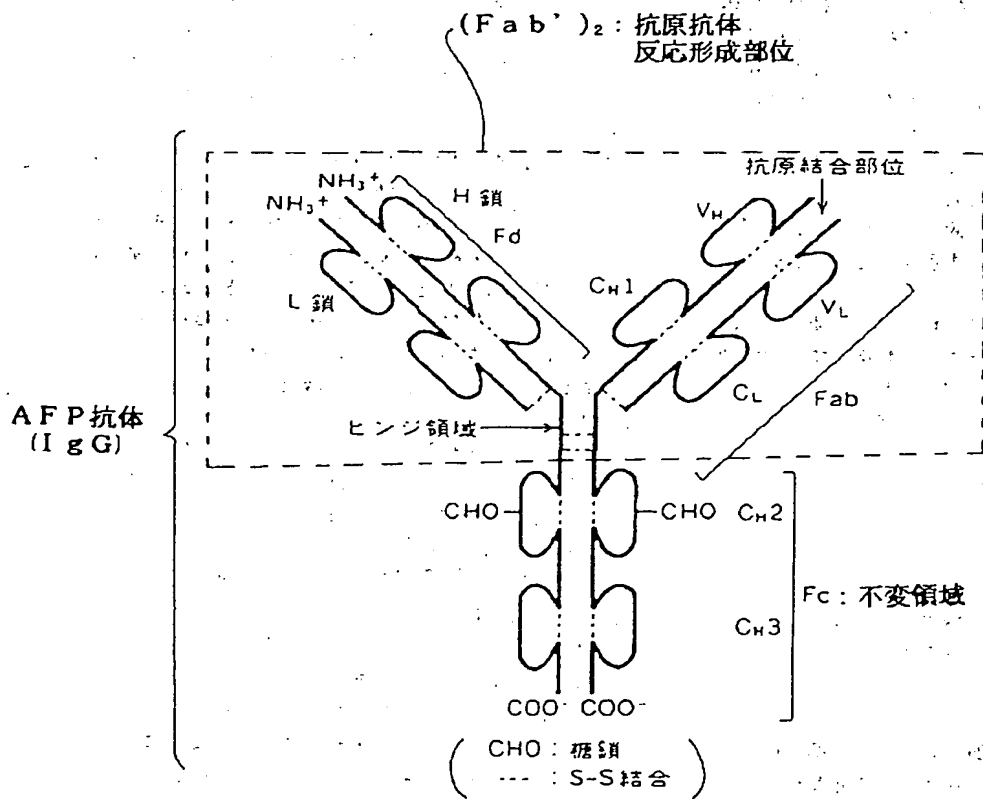
【図7】



【図9】



【図8】



【手続補正書】

【提出日】平成3年10月17日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】免疫学的定量分析方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 回転可能なディスク上の半径方向に形成した複数の流路の少なくとも1つの流路の一部に抗体を固定し、前記流路の内周部に体液を導入した後、ディスクを回転して体液をディスク上に展開し、体液中の分析対象物である抗原を、ディスク上に固定された抗体に抗原-抗体反応により捕捉せしめた後、さらに該抗原に、その抗原と特異的に反応する抗体を固定してなる不溶性担体粒子を作用させ、前記抗原により捕捉された不溶性担体粒子の数を、ディスクの半径方向に移動可能な光学読み取り装置を用いて、ディスクを回転させながら計数することを特徴とした免疫学的定量分析方法。

【請求項2】 回転可能なディスク上の半径方向に形成した複数の流路の少なくとも1つの流路の一部に抗原を固定し、前記流路の内周部に体液を導入し、体液中の分析対象物である抗体を、固定された抗原との抗原-抗体反応により捕捉せしめた後、さらに該抗体に、その抗体と特異的に反応する抗原を固定してなる不溶性担体粒子を作用させ、前記抗体により捕捉された不溶性担体粒子の数を、ディスクの半径方向に移動可能な光学読み取り装置を用いて、ディスクを回転させながら計数することを特徴とした免疫学的定量分析方法。

【請求項3】 光学読み取り装置の光源が収束レーザー光源であることを特徴とする請求項1または2記載の免疫学的定量分析方法。

【請求項4】 不溶性担体粒子の粒子径を、使用光源波長の1/5～1倍の大きさとしたことを特徴とする請求項1、2または3記載の免疫学的定量分析方法。

【請求項5】 不溶性担体粒子の粒子径を、0.1～5 μ mの大きさとしたことを特徴とする請求項1、2または3記載の免疫学的定量分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は免疫学的定量分析方法に関し、特に免疫学的検査の測定濃度領域の拡大、高感度化、高速度化及び全自動化を図ることのできる免疫学的定量分析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、医療分野においては、病気の早期発見等を目的として、体液中の微量成分の定量分析が頻繁に行なわれている。例えば、血液中の微量成分の定量

が行なわれているが、血液に含まれる体液成分はその濃度がng(ナノグラム)/mlオーダーと極めて微量なものが多く、これらの微量成分を定量的に分析することは医療分野における重要な課題となっている。

【0003】従来、血液微量成分の測定には、ラジオ免疫検査法(RIA法)、酵素免疫検査法(EIA法)あるいはラテックス凝集反応法(LIA法)などの免疫学的手法が用いられてきた。ここで、ラジオ免疫検査法(RIA法)は、放射性同位元素でラベルした抗体を用いて抗原-抗体反応を行なわせ、放射線量より抗原の濃度を求める方法である。

【0004】また、酵素免疫検査法(EIA法)は、酵素でラベルした抗体を用いて抗原-抗体反応を行なわせ、酵素反応による発色の程度により抗原の濃度を求める方法である。さらに、ラテックス凝集反応(LIA法)は、1965年にSingerとPlotzらによって開発された方法であり、抗体を固定してなる不溶性担体粒子(ラテックス)を用いて抗原-抗体反応を行なわせ、ラテックス粒子の凝集を生じさせて、濁度から抗原の濃度を求める方法である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上述した従来の血液微量成分の免疫学的定量分析法には、以下に示す問題がある。すなわち、ラジオ免疫検査法(RIA法)は、感度がよく精度が高いものの、放射線を使用するため安全性の面で問題があり、また保守、管理上細心の注意を払う必要があり、取扱いが非常に面倒であった。

【0006】また、酵素免疫法(EIA法)は、RIA法と同様に、感度が良く精度が高いものの、酵素を用いているため試薬の調製に時間と労力を要し、酵素の保管、保存の面でも細かい配慮を必要とし、測定時間も45分～数時間と長時間を要するという問題がある。さらに、ラテックス凝集法(LIA法)は、濁度を目視法によって判断するものであるため、半定量的であり、感度及び精度が不十分であるという問題がある。

【0007】なお、LIA法において、濁度を光学的に測定する方法が提案されている(1)Croatica Chemica Acta 42(1970) P457-466, 2) European Journal of Biochemistry Vol.20 No.4 (1971) P553-560, 3) Immunochemistry Vol.12 P349-851(1975) 参照)。しかし、この方法は、実験によると精度が悪く、また感度の面でもEIA法やRIA法に劣るという問題がある。また、LIA法において、ラテックスの径を種々変えて測定する方法(特開昭63-65369号)や、あるいは凝集したラテックスを順々に管内に流し光学的に測定する方法(特開昭60-111963号)が提案されているが、この方法は、感度の向上を図ろうとすると、それに伴って全体の作業が煩雑化し、高速度化が図れないという問題がある。

【0008】一方、特開昭56-151357号には、抗体を固定化した基板に被検液を接触させ、次いで抗体を固定した微粒子を反応させた後、基板上に捕捉された微粒子の数を計数することを特徴とする方法が開示されている。そして、基板上の異なる領域のそれぞれに異なる種類の抗体を固定することによって、同時多項目分析が可能である旨が記載されている。しかしながら、特開昭56-151357号には、抗体固定化基板としてスライドガラスを用いた例が示されているにすぎず、ディスクを用いる技術に関しては何ら開示されていない。スライドガラスを用いた場合には、スライドガラス上への被検液の滴下、洗浄及び計測を自動的かつ迅速に行なうことが困難である。また、被検液はスライドガラス上に滴下されるだけで薄膜状に展開されないで、反応効率を高めることが困難である。さらに、抗体固定微粒子の計測手段として顕微鏡等を用いているため、計測の自動化及び高速化が著しく困難であるという問題がある。

【0009】また、特開昭64-35373号には、上記特開昭56-151357号に記載の方法において微粒子として蛍光ラテックスを使用し、さらに計数手段として蛍光顕微鏡、TVカメラ、画像処理装置を用いることにより、計数の高感度化を図った技術が開示されている。しかし、これらの計数手段は、光ディスク技術を利用した計数手段に比べ、計数の自動化、高速化及び高感度化が困難であるという問題がある。

【0010】本発明は上述した問題点にかんがみてなされたもので、免疫学的検査の高感度化及び全自動化、高速化を図ることのできる免疫学的定量分析方法の提供を目的とする。

【0011】[課題を解決するための手段] 本発明者らは上記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、抗体固定基板として回転可能なディスクを使用するとともに、抗体固定微粒子の計数を光ディスク技術を利用して、ディスクを回転させながら光ヘッドで走査して行なうことによって、計数の自動化、高速化及び高感度化が図れることを見出した。そして、ディスクへの被検液の滴下（分注）、被検液の展開及び洗浄等の分析に必要な一連の操作をディスク上で全て行なわせると、分析の完全自動化及び迅速化が達成できることを見出し本発明を完成させるに至った。

【0012】すなわち本発明の免疫学的定量分析方法は、回転可能なディスク上の半径方向に形成した複数の流路の少なくとも1つの流路の一部に抗体もしくは抗原を固定し、前記流路の内周部又は固定部に体液を導入した後、ディスクを回転して体液をディスク上に展開し、体液中の分析対象物である抗原もしくは抗体を、ディスク上に固定された抗体もしくは抗原に抗原-抗体反応により捕捉せしめた後、さらに該抗原もしくは抗体に、その抗原もしくは抗体と特異的に反応する抗体もしくは抗

原を固定してなる不溶性担体粒子を作用させ、前記抗原もしくは抗体により捕捉された不溶性担体粒子の数を、ディスクの半径方向に移動可能な光学読み取り装置を用いて、ディスクを回転させながら計数するようにしてあり、好ましくは、光学読み取り装置の光源を収束レーザー光源とし、さらに好ましくは、不溶性担体粒子の粒子径を使用光源波長の1/5～1倍の大きさ、具体的には不溶性担体粒子の粒子径を0.1～5 μ mの大きさとしてある。

【0013】以下、本発明を図面を参照しつつ詳細に説明する。図1は本発明の免疫学的定量分析方法の手順を示す説明図である。本発明の免疫学的定量分析方法においては、抗体200を固定したディスク100（以下、抗体固定ディスクという）を使用する（図1（I））。

【0014】ここで、ディスク100の大きさ、厚さ、形状等は適宜選択され特に制限されないが、試料の展開及びレーザー光等による分析に適するように、回転可能なものであることが必要であり、このような観点からすると円板状（ディスク状）であることが好ましい。また、図2に示すように、ディスク100に多数の突条100aを放射状に形成して多数の試料展開面100b及び抗体200を固定した反応部100cを設けると、多数の試料の分析を同時に行なえる。

【0015】ディスク100の形成材料としては、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリウレタン、エポキシ樹脂等のプラスチック材料やガラス等の透明材料が挙げられるが、好ましくは、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート等のプラスチックディスクである。このようにディスクを透明材料で形成するのは、レーザー等による光学的分析を可能とするためである。

【0016】ディスク100に固定される抗体200は、測定しようとする抗原によって異なるが、例えば、測定しようとする抗原をある免疫動物（例えば、兔、山羊、羊など）に投与して産生させたポリクローナル抗体やモノクローナル抗体等が挙げられる。

【0017】抗体200をディスク100に固定するには、例えば、抗体の0.05M トリス緩衝食塩水（TB、S）溶液（pH8.2、濃度0.5～10 μ g/ml）あるいは0.05M 炭酸・重炭酸緩衝溶液（pH9.6、濃度0.5～10 μ g/ml）をディスク上に滴下し、4℃の温度下で一昼夜（あるいは20～30℃で2時間）放置して、抗体200をディスク100上に物理的に吸着させればよい。この場合、ディスク表面にスルホン基、アミノ基、カルボキシ基またはその誘導体等の官能基を有するディスクを用いることにより、抗体をディスク上に化学結合させることもできる（P.Tijssen著、石川栄治監訳“生化学実験法11 エンザイムアッセイ”東京化学同人刊、岩崎辰夫、安東民衛著“単クローン抗体ハイブリドーマとELISA”講談社刊参照）。

【0018】本発明方法においては、まず、上記抗体固定ディスク100上で、試料中の抗原300を抗原-抗体反応により捕捉せしめる(図1(II))。ここで、分析対象とされる試料としては、抗原を含む液体であれば特に制限されない。例えば、血液、尿等の体液を挙げることができる。分析対象物である抗原は特に制限されないが、例えば、C-反応性蛋白質(CRP)、 α -フエトプロテイン(AFP)、癌胎児性抗原(CEA)等が挙げられる。

【0019】ディスク100上で抗原-抗体反応を行なわせるには、例えば、抗体固定ディスク上に分析対象物である抗原300を含んだ検体試料を適量(例えば50 μ l程度)滴下し、ディスク100を回転して、遠心力によって検体試料をディスク100上に薄膜状に展開することによって、ディスク100上に固定された抗体200と検体試料中の抗原300との間に効率よく抗原-抗体反応を行なわせることができる。この場合、抗原-抗体反応に要する時間は1~5分程度の短い時間で済む。抗原-抗体反応後、捕捉された抗原300以外の残余の検体試料は、リン酸緩衝食塩水(PBS)(pH7.4)、あるいはトリス緩衝食塩水(TBS)(0.05M, pH8.2)等を適量(例えば、1ml程度)滴下した後、ディスク100を回転して洗い流す。次いで、上記抗原-抗体反応後のディスク100に、抗原300と特異的に反応する抗体400を固定してなる不溶性担体粒子500を作用させる(図1(III))。

【0020】ここで、抗体400を固定してなる不溶性担体粒子500とは、不溶性担体粒子(ラテックス)(例えば、プラスチック粒子、コロイド粒子等)に、分析対象物である抗原300に対する抗体400を、物理的あるいは化学的に吸着または結合させて固定したものをいう。具体的には、例えば、1.0%ラテックス水溶液に抗体を入れ、室温で2時間放置して、ラテックスに抗体を物理吸着させる。その後、遠心分離にかけた後、上清を捨て、吸着されなかった抗体を除去し、沈殿部にリン酸緩衝食塩水(PBS)(pH7.4)を注ぎ、再分散させて作成される(特開昭62-267298号, Applied and Environmental Microbiology, Oct. 1988, P2345-2348参照)。

【0021】不溶性担体粒子は、蛍光性を有するもの、あるいは着色されたものであってもよい。この場合、蛍光性あるいは着色性を利用した分析が可能となる。なお、不溶性担体粒子自体が蛍光物質で形成されている場合の他、蛍光材料でコーティングされている場合や蛍光物質が不溶性担体粒子に付着している場合も含まれる。なお、不溶性担体粒子の粒径については後述する。

【0022】上記のように調製された抗体を固定してなる不溶性担体粒子を含んだ水溶液は、上述した抗原-抗体反応後のディスク100に適量(例えば、50 μ l)滴下され、ディスク100の回転によって展開されて、

ディスク100上に固定された抗体200に捕捉された抗原300と、再度抗原-抗体反応を起こし、不溶性担体粒子500に固定された抗体400を介して、不溶性担体粒子が捕捉される(図1(III))。ディスク上に捕捉されなかった不溶性担体粒子は、上述した検体試料と同様の方法で洗い流される。このようにして、サンプルディスクが作製される。

【0023】次に、上記サンプルディスク上の抗原によって捕捉された不溶性担体粒子の数または粒子数に相当する物理量を測定手段600で測定して、抗原300の数(抗原の濃度)を求める(図1(IV))。ここで、粒子数等の測定手段600としては、光学的測定手段が好ましい。光学的測定手段としては、反射率の変化、特定波長の光に対する吸収、蛍光強度あるいは偏光した光の変光面の回転等の測定手段が例示される。

【0024】不溶性担体粒子の数を直接測定する場合には、光学的測定手段としてレーザーを用いる。使用されるレーザー源としては、一般に使用されている半導体レーザー等をそのまま利用でき、不溶性担体粒子の大きさに応じて適当なレーザー源が選択される。光学的測定手段を具備した分析装置としては、例えば、図3に示すような装置が使用される(特願平1-092367号参照)。

【0025】同図において、100はディスクであり、回転テーブル2上に装着されている。ディスク100の下部外周には、ディスク100から落ちる試料を受けるための受け皿6が配置され、回収タンク7に回収されるようになっている。モータ8はディスク100を回転させるためのものであり、駆動制御回路9はモータ8の駆動を制御するものである。ノズル11は、試料送り装置12から送られる試料をディスク100上に滴下する。光学式測定ヘッド14は、ディスク半径方向に延びる送りねじ軸15に沿って往復移動する。モータ16はヘッド14を駆動するためのものであり、駆動制御回路17はモータ16の駆動を制御する。光学式測定ヘッド14はレーザー光の投光部と受光部を有し、図4(a)に示すように、投光部からの照射光19はハーフミラー20、レンズ21を経て収束光として試料展開面100b上の試料に照射され、試料から反射された反射光22は受光部で受けられるようになっている。なお、図4(b)に示すように、ディスクの裏面側から投射光19を照射するようにしてもよく、また、反射光でなく、透過光によって分析を行なうようにしてもよい。これらの場合には回転テーブル2を透明材料で形成するか、あるいは回転テーブル2を取り払う。

【0026】信号処理装置23は、ヘッド14に信号を送り光源を点灯させる機能と、ヘッド14で受光された光信号を処理し、分析する機能を有する。ディスプレイ装置24は分析結果を画面表示し、記録装置25は分析結果をプリントアウトして出力する。CPU(中央処理装置)27は、試料送り装置12、駆動制御回路9及び

17、信号処理装置23等の制御を行ない、これをプログラム通り作動させる。CPU27は、プログラムの操作装置28と、プログラムの記憶装置29を有している。

【0027】上記構成からなる分析装置によれば、免疫学的定量分析の全ての工程をディスク上で行なうことができ、また、分析の全自動化を図ることができる。不溶性担体粒子が蛍光を発するものである場合には、光学的測定手段としてフォトディテクターを用いる。この場合、フィルターを介在させることによって、特定波長（例えば、397nm、472nm、577nmなど）の蛍光強度を検出し（図5（a））、その蛍光強度を粒子数に換算する（図5（b））。

【0028】なお、光学的測定手段と不溶性担体粒子の粒径との関係については次のことがいえる。光学的測定手段としてレーザーを用いる場合には、不溶性担体粒子の粒径が小さくなるとレーザー光に対する信号が弱くなりS/N比が悪くなるので好ましくない。一方、蛍光を発する不溶性担体粒子を用いる場合には、蛍光強度を粒子数に換算して、抗原濃度を測定しているので、粒径が小さくてもよい。上記の観点及び抗原-抗体の反応性からすると、不溶性担体粒子の粒径は0.1～5μmの範囲内であることが好ましい。

【0029】計測した不溶性担体粒子の個数から抗原の濃度を求めるには、抗原濃度既知の試料を用いること以外は上述の場合と同様にし、抗原濃度と不溶性担体粒子の数との関係を求めてあらかじめ検量線を作成しておく、この検量線から抗原濃度を求めればよい。なお、上述した本発明の免疫学的定量分析方法においては、説明の都合上、ディスク/抗体/抗原/抗体/不溶性担体粒子の構成となる場合を示したが、かわりに、ディスク/抗原/抗体/抗原/不溶性担体粒子の構成とし、抗体濃度の定量を行なうものとしてもよい。

【0030】

【実施例】以下、実施例にもとづき本発明をさらに詳細に説明する。

実施例1

C-反応性蛋白質（CRP）抗体のトリス緩衝食塩水（TBS）溶液（濃度 5.06×10^{-6} g/ml）5μlを、半径6.5cmの回転可能なポリカーボネートディスクの半径4cmの地点に滴下し、ディスクを回転させて300mm²の薄膜状に均一に展開した。温室で2時間放置した後、TBS溶液（0.05M、pH8.2）200μlで3回洗浄して抗体固定ディスクを作成した。

【0031】また、粒径0.2μmの不溶性担体粒子（ポリスチレンラテックス）を1wt%含むリン酸緩衝食塩水（PBS）（pH7.4）中に、ヒトCRPを兎に投与して得られた抗CRP抗体を入れ、十分攪拌してポリスチレンラテックスにCRP抗体を固定（感作）させた。これを遠心分離にかけた後、上清を除き、沈殿したラテ

ックスをPBSに再分散させ、抗体固定不溶性担体粒子（抗CRPラテックス）を作製した。

【0032】次いで、検量線作成のため、上記抗体固定ディスクを図3に示す分析装置の回転テーブル上にセットしTBSで調製したCRP濃度既知の標準試料（ 1.0×10^{-12} g/ml、 1.0×10^{-11} g/ml、 1.0×10^{-9} g/ml、 1.0×10^{-7} g/ml、 1.0×10^{-6} g/ml、 1.0×10^{-5} g/ml）を上記で作成した抗体固定ディスク上の抗体固定部に10μl滴下し、30℃で5分間反応させ、抗体固定ディスク上に固定された抗体に抗原を捕捉させた。その後、TBS（0.05M、pH8.2）200μlで3回洗浄して残っている試料を除去した。さらに、このディスク上に上記で作成した抗CRPラテックスのPBS溶液（ラテックス粒子径0.2μm、1wt%）50μlを、ディスク半径4cmの地点に滴下し、回転により展開して、30℃で5分間、インキュベーションし、その後TBS（0.05M、pH8.2）200μlで3回洗浄して検量線作成のためのサンプルディスクを作製した。

【0033】その後、1800rpmで回転させながら、ディスク上に捕捉されたラテックス粒子の個数を光学ヘッド14（830nmの波長の半導体レーザーを光源とする）で走査しながら計測した。この結果を表1に示す。また、この結果をもとに抗原濃度とラテックス粒子の個数の関係をグラフ化し、図6に示すような検量線を得た。

【0034】次に、被検者から採血した血液を常法（遠心分離）によって血清分離し、CRP濃度未知の試料を3種類用意し、各試料を本発明方法及び従来法（LIA法、三菱化成社製免疫検査装置LPIA100M使用）の両方法でCRP濃度の定量を行なった。

【0035】なお、本発明方法の手順は上述した検量線の作成の場合と同様であり、分析装置に装着した抗体固定ディスク上に被検試料を滴下し反応させ、さらにその上に抗CRPラテックスを50μl滴下し反応させ、ディスク上に捕捉させたラテックス粒子の個数を計測し、この計測されたラテックスの個数から、図6に示す検量線にもとづきCRP濃度を求めた。反応時間は10分、ラテックス計測時間5分、合計15分間であった。上記両方法によるCRP濃度の定量結果を表2に示す。

【0036】実施例2

不溶性担体粒子として、励起波長560nm、蛍光波長577nmを有する赤色蛍光物質を含有した粒径0.5μmのポリスチレンラテックスを用いたこと、TBSで調製したCRP濃度既知の標準試料の濃度を、 1.0×10^{-12} g/ml、 1.0×10^{-11} g/ml、 1.0×10^{-9} g/ml、 1.0×10^{-7} g/ml、 1.0×10^{-6} g/ml、 1.0×10^{-5} g/mlとしたこと、及び図3に示す分析装置における光学的測定ヘッドを560nm付近の単色光源及びフォトディテクターとし、図5に示したようにして蛍光強度からラテックスの個数を換算して検量線を作成したこと以外は実施例1と同様にして、上記CRP濃度未知の検体100倍希釈（TBSに希釈）試料

についてCRP濃度の定量を行なった。反応時間は10分、ラテックス計測時間は3分、合計13分間であった。CRP濃度の比較結果を表3に示す。また、得られた検量線を図7に示す。

【0037】

【表1】

$* 1 \times 10^{-12}$	1200
1×10^{-11}	1460
1×10^{-9}	2200
1×10^{-7}	2890
1×10^{-6}	3150
1×10^{-5}	3360

抗原濃度 (g/ml) ラテックス 数 (個/360 μ m²)

【0038】

* 【表2】

検体番号	CRP濃度 (ng/ml)	
	本発明法	L I A法
1	319	320
2	541	540
3	210	210

【0039】

【表3】

検体番号	CRP濃度 (ng/ml)	
	本発明法	L I A法
4	3.3	測定不能
5	5.4	6
6	2.0	測定不能

【0040】

【表4】

抗原 (AFP) 濃度 (g/ml)	ラテックス 数 (個/1000 μ m ²)
1.0×10^{-12}	270
1.0×10^{-10}	395
1.0×10^{-8}	630
1.0×10^{-6}	1410

【0041】表2及び表3から明らかなように、本発明方法は従来法 (R I A法, E I A法) に比べ、0.01~0.1 (ng/ml) のオーダーまで測定でき、感度が高く、したがって1 ng/ml 以下の極微量成分の定量が可能となる。また、検査にかかる所要時間は、従来法 (L I A法) が1~2時間なのに対し、本発明方法は10分~30分であり、検査の高速度化を実現しうる。さらに、従来法 (L I A法, E I A法) は出力信号がアナログなのに対し、本発明方法においては出力信号をデジタル化できるため S/N比の向上、回路の簡便さという利点を有する。

【0042】実施例3 α -フェトプロテイン (AF

P) の定量

(1) ヒトAFPを予め兔に投与して得られたAFP抗体 (I g G) を従来法 (石川栄治：酵素免疫測定法 第3版 医学書院、小山次郎、大沢利昭著：免疫学の基礎 東京化学同人刊 P30~P34 参照) によりペプシンで消化し、I g Gの不変領域Fc部を除去し抗原抗体反応形成部位である (F a b')₂ を得た。(図8参照)。

【0043】(2) 上記実施例と同様にチャンネルを設けた回転可能なポリカーボネートディスク上のチャンネル内の半径3.5cmの部位に地点に (F a b')₂ のTBS溶液 (濃度 2.3×10^{-4} g/ml) 20 μ l を滴下し、30℃の状態に2時間静置しディスク上に抗体感作 (物理吸着) さ

せた。その後吸着されなかった抗体をTBS 200 μ lで3回洗浄し除去した。

【0044】(3) BSA (牛血清アルブミン) 0.5 %含有TBS溶液10 μ lを該抗体固定位置に滴下し、4℃の状態では24時間静置し、その後、界面活性剤であるTween-20を0.1%含有したTBS溶液 (pH 8.2) 200 μ lで3回洗浄した。

【0045】(4) 一方、読み取り使用光源である半導体レーザー (波長 780nm) の1/2.6 倍波長の大きさである ϕ 300nm (0.3 μ m) のポリスチレンラテックスに上記(1)で得た抗体を実施例1の如く抗体感作し、感作ラテックスを作製した (ラテックス濃度: 0.25wt% TBS溶液)。

【0046】(5) 検量線作成のため濃度既知のAFP抗原標準溶液 (1.0 $\times 10^{-12}$ g/ml, 1.0 $\times 10^{-10}$ g/ml, 1.0 $\times 10^{-8}$ g/ml, 1.0 $\times 10^{-6}$ g/ml TBSにより希釈) を20 μ lディスク上抗体固定部位に滴下し、30℃の状態では5分間静置し抗原抗体反応させ、ディスク上の固定抗体によりAFP抗原を捕捉させた。その後、未反応の試料は実施例1と同様にTween-20含有TBS溶液 (Tween-20濃度 0.1%) 200 μ lで3回洗浄した。

【0047】(6) 上記(4)で調整したAFP抗体感作ラテックス20 μ lを該抗原捕捉部位に滴下し、30℃の状態では5分間静置し抗原抗体反応させ、該抗原にラテックスを捕捉させた。捕捉されずに残ったラテックスは、Tween-20含有TBS溶液200 μ lで3回、さらに蒸留水 500 μ lで洗浄し塩とともに除去し、サンプルディスクを作製した。

【0048】(7) その後、サンプルディスクを1800rpmで回転させ波長 780nmの半導体レーザーを光源とした図3に示した光学ヘッド14を走査させながらディスク上に捕捉されたラテックスの個数を計測した。計測結果を表4に示し、これらの個数をAFP抗原との関係をグラフ化した検量線を図9に示す。

【0049】(8) 被検者から採血した血液を実施例1同様、従来法で遠心分離し血清を得た。この血清20 μ lを上記(5)と同様に本発明法により反応させ、ラテックス数を計数し検量線から濃度を検出したところ、0.1 μ g/ml (1 $\times 10^{-10}$ g/ml)の結果を得た。従来のRIAにより測定したところほぼ同じ結果が得られた。また、従来のLIA法の三菱化成LP1A100Mでは上記の被検試料は測定出来なかった。被検試料滴下からラテックス個数計測までに要した時間は15分であった。

【0050】

【発明の効果】以上説明したように本発明の免疫学的定量分析方法によれば、免疫学的検査の測定濃度領域の拡大、高感度化及び高速化を図ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の免疫学的定量分析方法の手順を示す説

明図である。

【図2】複数試料の同時分析を行なうための複数に区画されたディスクを示す平面図である。

【図3】分析装置の一例を示す構成図である。

【図4】光学的分析手段による測定の態様を示す図である。

【図5】蛍光強度を粒子数に換算する方法を示すグラフである。

【図6】実施例1における検量線を表わすグラフである。

【図7】実施例1における検量線を表わすグラフである。

【図8】実施例3で用いた抗原抗体反応形成部位 (Fab')₂を示す図である。

【図9】実施例3における検量線を表わすグラフである。

【符号の説明】

100 : ディスク
200 : 抗体
300 : 抗原
400 : 抗体
500 : 不溶性担体粒子

【手続補正2】

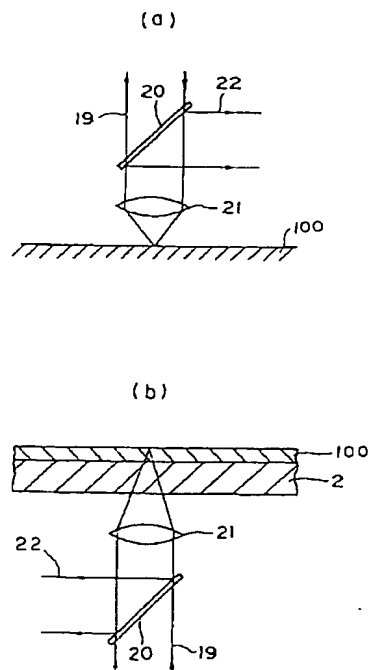
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図4

【補正方法】変更

【補正内容】

【図4】



(16)

特開平 5 - 5 7 4 1

フロントページの続き

(72)発明者 河野 孝之
千葉県袖ヶ浦市上泉1660番地 出光石油化
学株式会社内